

KUALITAS EMBRIO HASIL FERTILISASI IN VITRO MENGGUNAKAN SEMEN BEKU YANG DI THAWING DENGAN SUHU YANG BERBEDA

THE QUALITY OF EMBRYOS RESULTED FROM IN VITRO FERTILIZATION BY USING FROZEN SEMEN THAWED IN DIFFERENT TEMPERATURES

R Yasyri^{1a}, R Handarini¹, dan M Imron²

¹Program Studi Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Djuanda Bogor, Jl. Tol Ciawi No. 1, Kotak Pos 35 Ciawi, Bogor 16720.

²Balai Embrio Ternak

^aKorespondensi: Rakhmi Yasyri, E-mail: yasyrirochmana76@gmail.com

(Diterima oleh Dewan Redaksi: xx-xx-xxxx)

(Dipublikasikan oleh Dewan Redaksi: xx-xx-xxxx)

ABSTRACT

In vitro fertilization technology in cows is an effort done to utilize ovary waste from cows slaughtered in abattoir. This study was aimed at assessing the quality of embryos resulted from in vitro fertilization by using frozen semen thawed in different temperatures. In order to get quality semen, standardized thawing method is required. It was expected from this study that an optimum thawing temperature for frozen semen was determined to obtain quality transferable embryos. Three treatments consisting of thawing with water 37°C for 30 second (T1), thawing with water 25°C for 30 second (T2), and thawing with water 10°C for 30 second (T3). Data were subjected to an analysis of variance (Anova) and a Duncan test. Results showed that oocytes fertilized with frozen semen thawed at 37°C and 10°C had higher fertilization rate and excellent-grade embryos ($P < 0.05$) than did the ones fertilized with frozen semen thawed at 25°C. However, no different effect of thawing temperatures was found on transferable and degenerated embryos ($P > 0.05$). It was concluded that embryos fertilized with Brahman frozen semen in thawed at 37°C had the highest number of embryos (49.66 ± 2.88) and excellent-grade embryos (22.00 ± 4.35).

Key words: *Embryo quality, In vitro fertilization, frozen semen thawing, Brahman bull.*

ABSTRAK

Teknologi Fertilisasi In Vitro pada sapi merupakan salah satu usaha memanfaatkan limbah ovarium dari induk sapi betina yang dipotong di Rumah Potong Hewan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kualitas embrio dari hasil FIV dengan semen beku yang di *thawing* dengan suhu berbeda. Perlakuan dalam penelitian ini adalah: T1 = *thawing* menggunakan air bersuhu 37°C selama 30 detik, T2 = *thawing* dengan air bersuhu 25°C selama 30 detik dan T3 = *thawing* dengan air bersuhu 10°C selama 30 detik. Data yang diperoleh ditabulasi dan dilakukan analisis ragam (ANOVA), dan uji lanjut Duncan. Dari hasil analisis ragam menunjukkan oosit yang difertilisasi dengan menggunakan semen beku yang di *thawing* pada suhu 37°C dan 10°C menghasilkan tingkat fertilisasi dan embrio excellent secara nyata lebih baik ($P < 0,05$) dibandingkan perlakuan *thawing* suhu 25°C. Perbedaan suhu *thawing* tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap embrio layak transfer maupun embrio degenerasi. Kesimpulan penelitian Kualitas embrio hasil fertilisasi in vitro menggunakan semen beku sapi Brahman pada suhu 37°C memperoleh hasil terbaik dengan rata-rata jumlah embrio (49.66 ± 2.88) dan jumlah embrio kualitas *excellent* (22.00 ± 4.35).

Kata Kunci: kualitas embrio, *fertilisasi in vitro*, *thawing* semen beku, sapi brahman.

PENDAHULUAN

Kebutuhan konsumsi daging nasional cenderung meningkat se-tiap tahunnya. Oleh karena itu di-butuhkan peningkatan populasi ternak terutama ternak ruminansia melalui ketercukupan penyediaan bibit baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya. Peningkatan produk-tivitas ternak dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satu-nya adalah dengan menerapkan teknologi Fertilisasi In Vitro. Menurut Supri Ondho (1998) secara garis besar percobaan FIV meliputi se-rangkaian kegiatan berupa me-ngumpulkan ovarium, koleksi oosit, kapasitas spermatozoa, pembuahan dan perkembangan embrio. Semen yang digunakan pada metode FIV ini adalah semen beku yang melalui proses pencairan kembali atau thawing. Berbagai pendapat di-kemukakan mengenai waktu thawing yang paling baik agar memperoleh hasil yang optimum. Menurut Samsudewa dan Suryawijaya (2008), thawing pada suhu 37°C memberikan hasil yang optimum. Menurut Van Demark dan Salisbury (1985), thawing pada suhu 5°C akan menghasilkan pergerakan yang lebih baik daripada thawing pada suhu 38°C. Metode thawing semen beku menjadi salah satu faktor yang sangat menentukan karena bila thawing dilakukan pada suhu yang tidak tepat akan menimbulkan ke-rusakan pada spermatozoa sehingga menurunkan kualitas semen.

Perbedaan laju pemulihan kembali disebabkan oleh suhu yang digunakan pada saat thawing. Mole *et al.* (2003) menyatakan bahwa spermatozoa sangat cepat terpe-ngaruh oleh perbedaan suhu selama proses pendinginan, pembekuan ataupun thawing. Beberapa metode thawing yang dilaksanakan antara lain penggunaan air hangat, peng-gunaan air es dan penggunaan air kran. Menurut Soepriondho (1985), suhu yang tinggi dalam media thawing akan menyebabkan proses metabolisme spermatozoa meninggi sehingga memerlukan energi yang tinggi pula. Kondisi demikian me-nyebabkan spermatozoa akan cepat kehilangan energi sehingga ber-akibat kematian sel spermatozoa.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kualitas embrio hasil fertilisasi in vitro dengan semen beku yang di *thawing* dengan suhu berbeda. Penelitian ini diharapkan memperoleh suhu optimum *thawing* semen beku untuk mendapatkan embrio yang berkualitas dan

layak transfer. Hipotesis yang diajukan dalam proposal penelitian ini adalah adanya pengaruh perbedaan suhu *thawing* semen beku yang di-gunakan untuk fertilisasi in vitro terhadap jumlah dan kualitas embrio

MATERI DAN METODE

Materi

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan juni-juli 2016 di Balai Embrio Ternak Cipelang Bogor. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: ovarium sebagai sumber oosit. Media yang disiapkan adalah media transportasi dan penyim-panan ovari, media PBS untuk aspi-rasi oosit, media TCM-199, semen beku, media BO dan media CR1aa. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: mikroskop stereo, pipete pasteur dan selang silikon, termos, tissue steril, hot plate, beaker glass, ovarium, cawan petri 90 x 100 mm, cawan petri 35 x 10 mm, water bath, jarum suntik 18 G, spuit 5 ml, pinset, gunting stainless, mikrofilter 0,22 µl, mesin centrifuge, Inkubator CO2.

Perlakuan

Perlakuan yang diberikan dalam penelitian ini adalah: T1= thawing dengan air bersuhu 37°C selama 30 detik. T2 = thawing dengan air bersuhu 25°C selama 30 detik. T3 = thawing dengan air bersuhu 10°C selama 30 detik

Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian yang di-gunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) terdiri atas: 3 perlakuan dan 3 ulangan. Model matematika untuk RAL me-nurut Steel dan Torrie (1993) se-bagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Peubah yang Diamati

Peubah yang diuji dalam penelitian ini adalah: (1) Jumlah embrio yang dikoleksi yaitu koleksi embrio dari hasil fertilisasi in vitro. (2) Kualitas embrio yang diperoleh dari hasil evaluasi embrio, dike-lompokkan kedalam grade: 1, 2, 3, 4. (3) Embrio yang mengalami degenerasi adalah embrio yang tidak dapat ditransfer kepada resipien.

Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasi dan dilakukan analisis ragam (A-NOVA), bila menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$) maka dilakukan uji lanjut Duncan.

Prosedur Pelaksanaan

Media yang digunakan untuk transportasi ovarium adalah larutan RL yang ditambahkan antibiotik sebanyak 0,1% pada suhu kamar. Media koleksi oosit yang digunakan adalah PBS yang ditambahkan FCS 3% dan antibiotik 1%. Media maturasi adalah TCM-199 pada suhu $38,5^{\circ}\text{C}$ dengan kandungan CO_2 2–5%. Ovarium dikoleksi dari RPH segera setelah sapi betina dipotong. Ovarium dicuci dengan laktat ringar dan dimasukan ke dalam termos yang telah berisi media penyimpanan ovarium untuk dibawa ke laboratorium. Selama transportasi suhu media dijaga minimal 24°C (Gordon 1994). Setelah tiba di laboratorium ovarium dibersihkan dari organ-organ yang masih melekat dengan menggunakan gunting steril kemudian dicuci sebanyak 2–3 kali dengan menggunakan RL yang ditambahkan antibiotik 0,1%. Kemudian ovarium dimasukan ke dalam beaker glass yang berisi RL yang ditambahkan antibiotik 0,1% dan dikelompokkan sesuai dengan fasenya yaitu luteal (mengandung korpus luteum) dan folikuler (mengandung folikel). Selama persiapan, ovarium dan media diletakkan dalam hot plate untuk menjaga kestabilan suhu.

Koleksi oosit dengan metode aspirasi. dengan menggunakan syringe 5 ml dan jarum suntik 18 G yang berisi larutan PBS dan sudah disuplementasi dengan FCS 3%. Folikel yang berukuran 2–6 mm diaspirasi dengan cairan folikelnya, hasil aspirasi diletakkan di cawan petri bergaris yang berukuran 90x100 mm. Setelah selesai koleksi oosit dilakukan grading oosit. Oosit yang telah diseleksi dan melalui dua kali pencucian dengan media PBS untuk selanjutnya dimaturasi dalam medium TCM 199 yang ditutup dengan mineral oil, selanjutnya dimasukan ke dalam inkubator CO_2 5% pada temperature $38,5^{\circ}\text{C}$, kandungan CO_2 2–5% selama 18–22 jam. Oosit yang telah dimaturasi diseleksi dipindahkan ke cawan petri berdiameter 35x10 mm. Straw semen beku dari bangsa sapi Brahman dengan kode 40784 dicairkan (thawing) sesuai perlakuan yaitu masing-masing pada suhu: 37°C , 25°C dan 10°C . Spermatozoa dicampur dengan 1 ml medium BO. Larutan campuran sperma disentrifuse pada

1800 rpm selama 5 menit. Semen diencerkan hingga mencapai konsentrasi 12.5×10^6 dan dimasukkan dalam drop semen yang telah ditutup mineral oil. Oosit yang telah dimaturasi dicuci kemudian dimasukkan ke dalam drop semen dan diinkubasi dalam inkubator CO_2 selama 5–18 jam. Bersamaan dengan persiapan spermatozoa, sel telur yang telah diinkubasi dalam inkubator CO_2 selama 24 jam dicuci berturut-turut 2 kali dalam larutan Bench dan 1 kali dalam medium Fertilisasi selama 18–24 jam. Perkembangan embrio dievaluasi sampai 6 hari dari waktu fertilisasi (hari ke-7 setelah penampungan sel telur) dengan menggunakan mikroskop. Pencarian embrio dilakukan di bawah mikroskop stereo dengan pembesaran 70x. Embrio yang teramati dikumpulkan dalam media penyimpanan embrio untuk dievaluasi berdasarkan tahapan perkembangan morfologinya untuk menentukan kualitas embrio. Jumlah embrio yang telah dikoleksi dihitung berdasarkan gradennya sesuai dengan pedoman dari International Embryo Transfer Society (IETS), yaitu: grade 1 (yang layak transfer) dan grade 2,3,4 (tidak layak transfer).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah Embrio

Dalam hal jumlah embrio Motilitas atau daya gerak individu spermatozoa mempunyai peranan penting untuk keberhasilan fertilisasi (Widyastuti 2001). Dengan prediksi, melalui kualitas semen yang baik dan tingkat kematangan oosit yang baik, maka diharapkan akan semakin banyak oosit yang mampu dibuahi dan berkembang menjadi embrio. Hasil pengamatan dari jumlah embrio yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 1. Diharapkan akan semakin banyak oosit yang mampu dibuahi dan berkembang menjadi embrio. Hasil pengamatan dari jumlah embrio yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Rataan Jumlah Embrio Sapi Brahman hasil Fertilisasi Embrio

Perlakuan	Jumlah Embrio
T1 (37°C)	49.66 ± 2.88^b
T2 (25°C)	19.00 ± 2.64^a
T3 (10°C)	33.33 ± 17.03^b

Keterangan: Huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$)

Pada Tabel 1 dapat dilihat rata rata embrio tertinggi dengan menggunakan perlakuan *thawing* suhu 37°C (49.66±2.88) dan terendah perlakuan *thawing* suhu 25°C (19.00±2.64). Dari hasil analisis ragam menunjukkan oosit yang difertilisasi dengan menggunakan semen beku yang *dithawing* pada suhu 37°C dan 10°C menghasilkan tingkat fertilisasi secara nyata lebih baik ($P<0,05$) dibandingkan perlakuan *thawing* dengan suhu 25°C. Sifat semen beku yang sangat labil mengakibatkan kondisi membran spermatozoa memiliki tingkat kerentanan yang cukup tinggi dan pengaruh *cold shock* yang akan mengakibatkan kematian spermatozoa mencapai 30% dari jumlah spermatozoa segar atau setelah diencerkan dan ke-rusakan akibat pengaruh pendinginan (Goldman *et al.*, 1991). Thawing semen beku pada suhu yang tepat sangat, diperlukan karena suhu thawing yang tidak tepat dapat menurunkan kualitas spermatozoa. Proses thawing dapat mem-pengaruhi stabilitas dan fungsifungsi hidup membrane sel sperma-tozoa (Einarsson 1992).

Ansari *et al.*, (2010) melaporkan motilitas, viabilitas dan integritas membran tertinggi yaitu thawing pada air bersuhu 37°C selama 30 detik. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1, dengan adanya perbedaan yang nyata pada rata-rata perolehan embrio pada perlakuan thawing suhu 25° (19.00±2.64). Selain itu proses pembekuan dan thawing dapat menginduksi kerusakan sperma-tozoa yang berakibat pada penurunan kualitas (Zilli *et al.* 2005), pe-nurunan motilitas sebesar 40% (Tanaka *et al.* 2000), peningkatan abnormalitas dan penurunan viabilitas sebesar 20-30% (Dhanju *et al.* 2001), penurunan integritas membran plasma (Nishizono *et al.* 2000), adanya penurunan kualitas spermatozoa akan mengakibatkan penurunan kemampuan fertilisasi spermatozoa.

Embrio Excellent

Untuk kualitas embrio yang dievaluasi merupakan embrio dengan kualitas *excellent* (layak untuk ditransfer). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan suhu *thawing* 37°C (22.00±4.35), suhu *thawing* 10°C (12.00±6.92) dan suhu *thawing* 25°C (4.33±2.51) menghasilkan embrio dengan kualitas *excellent*. Dari data hasil penelitian Tabel 2 dapat dilihat bahwa jumlah rata-rata embrio kualitas *excellent* pada perlakuan semen beku yang *dithawing* pada suhu 37°C memperoleh rata-rata embrio kualitas *excellent*

paling tinggi (22.00±4.35) dibandingkan dengan perlakuan *thawing* suhu 10°C (12.00±6.92) dan 25°C (4.33±2.51).

Tabel 2 Rataan Embrio Sapi Brahman dengan Kualitas Excellent hasil FIV

Perlakuan	Jumlah Embrio	Excellent Embrio	Rata-rata Embrio
T1 (37°C)	149	66	22.0±4.35 ^b
T2 (25°C)	57	13	4.33±2.51 ^a
T3 (10°C)	100	36	12.0 ±6.92 ^a

Keterangan: Huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0.05$)

Disamping kondisi oosit, keberhasilan FIV sendiri dipengaruhi oleh: spermatozoa yang digunakan, metode kapasitasi spermatozoa, konsentrasi spermatozoa yang di inseminasikan dan medium kultur. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perbedaan suhu thawing berpengaruh nyata ($P<0.05$) terhadap embrio layak transfer. Tingginya perolehan embrio excellent pada perlakuan suhu 37°C sesuai dengan penelitian Ansari *et al.* (2010) yang melaporkan motilitas, viabilitas dan integritas membran tertinggi yaitu thawing pada air bersuhu 37°C selama 30 detik. Kualitas embrio excellent yang didapatkan menghasilkan nilai tertinggi jumlah embrio yang mencapai tahap morula atau blastosis, karena pada tahapan tersebut embrio lebih tahan terhadap pembekuan dan layak untuk di-transfer koresipien.

Berbagai faktor yang mempengaruhi keberhasilan produksi embrio, antara lain: kualitas oosit, kemampuan fertilisasi spermatozoa dan sistem kultur yang digunakan. Periode produksi embrio in vitro terlama disimpan pada media kultur dibandingkan dengan media maturasi dan fertilisasi, sehingga selain suhu *thawing* semen beku yang optimal maka kultur media memiliki kontribusi yang besar dalam waktu perkembangan awal embrio, kualitas blastosis, serta jumlah sel embrio (Nedambale *et al.* 2006). Faktor yang mempengaruhi perkembangan embrio adalah kualitas embrio dan lingkungan mikro IVF (Puchner, 2006).

Embrio Degenerasi

Embrio yang mengalami degenerasi adalah embrio yang tidak dapat ditransfer kepada resipien. Rataan embrio degenerasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3 Rataan Embrio Degenerasi Sapi Brahman hasil FIV

Perlakuan	Jumlah Embrio	Degenerating Embrio	Rata-rata
T1 (37°C)	149	83	14.66±3.51
T2 (25°C)	57	44	21.33±11.23
T3 (10°C)	100	64	21.22±8.33

Hasil analisis ragam embrio degenerasi menunjukkan bahwa perlakuan suhu thawing menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0.05$). Perlakuan thawing semen beku pada suhu 37°C menghasilkan jumlah rata rata embrio degenerasi tidak berbeda nyata terhadap rata-rata embrio degenerasi thawing pada suhu 10°C dan suhu 25°C. Pembekuan dan thawing dapat menginduksi kerusakan spermatozoa yang berakibat pada penurunan kualitas (Zilli *et al.* 2005) seperti penurunan motilitas sebesar 40% (Tanaka *et al.* 2000), peningkatan abnormalitas dan penurunan viabilitas sebesar 20 – 30% (Dhanju *et al.* 2001), penurunan integritas membran plasma (Nishizono *et al.* 2000), adanya penurunan kualitas spermatozoa akan mengakibatkan penurunan ke-mampuan fertilisasi spermatozoa (Zilli 2005). Darnel *et al.* (1990) menyatakan bahwa terjadi perubahan suhu yang tidak sesuai secara ekstraseluler, maka permeabilitas fosfolipid hidrofilik rusak menyebabkan fluiditas membran terganggu sehingga terjadi kematian spermatozoa.

Perbedaan dalam perkembangan embrio juga diakibatkan oleh ke-mampuan media fertilisasi untuk melakukan kapasitasi spermatozoa. Di samping itu, kemungkinan lainnya yang menyebabkan masih rendahnya perkembangan embrio lanjut adalah dukungan dari kualitas media kultur pasca fertilisasi (Lonergan *et al.* 2004). Kegagalan fertilisasi dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain yaitu, tingkat pematangan oosit (inti maupun sitoplasma) yang kurang sempurna, kemampuan spermatozoa memfertilisasi oosit (kapasitasi dan reaksi akrosom) yang kurang memadai sehingga menyebabkan spermatozoa tidak mampu membuahi oosit, kegagalan spermatozoa mengalami kondensasi dalam sitoplasma oosit sehingga terjadi kegagalan pembentukan pronukleus jantan (Bavers *et al.* 1997; Boediono *et al.* 2000).

Menurut Cohen *et al.* (1969) dalam Harjanti (2002), pada dasarnya terdapat dua jenis abnormalitas yang terjadi pada proses fertilisasi

yaitu, yang pertama adalah kegagalan dalam penetrasi spermatozoa ke dalam oosit dan hambatan dekon-densasi spermatozoa dan yang ke-dua adalah terdapat dua atau lebih pronukleus akibat masuknya lebih dari satu spermatozoa ke dalam oosit sehingga menyebabkan terjadinya poliploid pada zigot. Pada penelitian ini, perlakuan dengan suhu 10°C dan 25°C kemungkinan kegagalan melakukan penetrasi dan dekon-densasi spermatozoa ke dalam oosit diduga menyebabkan degenerasi embrio tahap 1 sel dan terdapatnya lebih dari satu spermatozoa yang dapat menembus membran vitelin oosit disebut polisperma. Peristiwa ini akan menyebabkan terjadinya peningkatan terhadap abnormalitas embrio sehingga diduga akan menghambat perkembangan embrio lebih lanjut. Kualitas oosit sangat berpengaruh terhadap terjadinya polispermi. Umur oosit dapat mengurangi ketahanan reaksi zona terhadap penangkisan terjadinya polispermi yang akan menembus zona dan vitellin (Toelihere 1979).

Kelayakan Embrio

Kelayakan pada perkembangan embrio diakibatkan oleh kemampuan media fertilisasi untuk melakukan kapasitasi spermatozoa, kemungkinan lainnya yang menyebabkan masih rendahnya perkembangan embrio lanjut adalah dukungan dari kualitas media kultur pasca fertilisasi (Lonergan *et al.* 2004). Perbedaan individu oosit yang diindikasikan dengan perbedaan berbagai parameter seperti jumlah mitokondria dapat menyebabkan perbedaan kualitas embrio yang dihasilkan (Tamasia *et al.* 2004). Persentase embrio layak transfer (PELT) dan embrio tidak layak transfer dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 Persentase Embrio layak transfer (PELT) dan tidak layak transfer (PELTL) sapi brahman hasil FIV

Perlakuan	Persentase Embrio Layak transfer (%)	Persentase Embrio Tidak Layak transfer (%)
T1 (37°C)	44.30	55.70
T2 (25°C)	22.81	77.19
T3 (10°C)	36.00	64.00
Rataan	34.74±13.57	65.26±13.57

Salah faktor yang mempunyai peranan yang menentukan dalam program FIV adalah bukan pada aspek kuantitas embrio yang terkoleksi tetapi pada aspek kualitas dari embrio yang terkoleksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proporsi Embrio Layak Transfer (PELT) hasil FIV pada perlakuan *thawing* semen beku suhu 37°C lebih tinggi (44.30%) di-bandingkan dengan perlakuan lainnya. Hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Marsan (2012) yang menghasilkan PELT sebesar 51.3%. Sedangkan pada perlakuan *thawing* suhu 25°C menghasilkan PETLT yang paling tinggi (77.19%). Banyaknya embrio yang tidak berkembang secara normal akan berpengaruh terhadap tingginya persentase embrio yang tidak layak transfer (Grimes 2008).

Faktor yang dapat menyebabkan tingginya tingkat embrio yang tidak layak transfer adalah kondisi ovum, tingkat fertilisasi, dan perkembangan embrio yang terganggu (Riandi 2001). Salah satu faktor yang dapat menghambat perkembangan embrio adalah ketersediaan nutrisi selama proses kultur, setiap stadium embrio mempunyai kemampuan untuk me-manfaatkan sumber energi yang berbeda-beda sehingga nutrisi dalam medium harus sesuai dengan stadium perkembangan embrio. McLaren (1982) mengemukakan bahwa perkembangan embrio ter-gantung pada energi yang di-sediakan terus menerus oleh lingkungan mikronya.

KESIMPULAN DAN IMPLIKASI

Kesimpulan

Kualitas embrio hasil fertili-sasi in vitro menggunakan semen beku sapi Brahman yang di *thawing* pada suhu 37°C selama 30 detik memperoleh hasil terbaik dengan rata-rata jumlah embrio (49.66 ± 2.88), rata-rata embrio kualitas *excellent* (22.00 ± 4.35), embrio layak transfer (44.30 %).

Implikasi

Disarankan untuk FIV pada sapi Brahman menggunakan semen beku yang dithawing pada suhu 37°C

DAFTAR PUSTAKA

Ansary MS, Bushra A, Rakha, Akher S. 2010. Effect of Straw Size and Thawing Time on Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus*

bubalis) Semen. *J Reproductive Biology*. 11(1):49-54.

Bavers MM, Dieleman S, Van den Hurk R, Radyar F. 1997. Regulation and Modulation of Oocytes Maturation in The Bovine. *Theriogenology*. 47: 12-21.

Boediono A, Rusianto Y, Mohamad K, Djuwita I, Herliatien. 2000. Perkembangan Oosit Kambing Setelah Maturasi, Fertilisasi dan Kultur In Vitro. *Media Veteriner*. 7(4):11.

Chaiprasat S, Benjakul W, Chartchue A, Joemplang P, Punyapornwithaya V. 2006. Effect of Bull Semen Thawing Methods on Sperm Progressive Motility. *Chiang Mai Veterinary Journal* 4(1):25-29.

Darnel J, Lodish H, Baltimore D. 1990. Molecular Cell Biology. 2th ed. Sci. Am. Book.

Dhanju CK, Cheema RS, Kaur SP. 2001. Effects of Freezing On Protein and Profiles Of Sperm Membrane Extracts and Seminal Plasma of Buffalo Bulls. *Journal of Department of Animal Breeding, College of Veterinary Sciences, Punjab Agricultural University, Ludhiana, India*.

Einarsson S. 1992. Concluding Remarks. In: Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen stallion spermatozoa. Bor K, B Colenbrander, A Fazelli, J Pallevliet and L Malmgren (eds.) *Theriogenology* VI. 48th. 1997. Pp.531-536.

Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. in *Reproduction In Farm Animals*. Edited by E. S. E. Hafez. 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland. USA.

Goldman EE, Ellington JE, Farrel FB, Foote RH. 1991. Use Of Fresh And Frozen Thawed Bull Sperm In vitro. *Theriogenology* 35:204.

- Gordon I. 2003. Laboratory Production of Cattle Embryos. 2nd ed. CABI Publishing, CAB International, Willingford, UK.
- Grimes JF. 2008. Utilization of Embryo Transfer in Beef Cattle. ANR-17-8. http://ohioline.osu.edu/anr-fact/pdf/ANR_17_08.pdf [30 Mei 2015].
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland M, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development* (37):48-53.
- Nedambale TL, Du F, Yang X, Tian XC. 2006. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced blastocysts following culture in defined medium supplemented with β mercaptoethanol. *Anim. Reprod. Sci.* 93:61-75.
- Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N. 2004. Decrease of Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa After Freezing And Thawing Is Related To Cellular Injury. *Biology of Reproduction* 71:973-978.
- Puchner AM. 2006. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reproductive Bio Medicine Online* 12(1):95-101.
- Riandi A. 2001. Kajian Efektivitas Dosis Hormon Follicle Stimulating Hormone (FSH) dalam Metoda Superovulasi pada Ternak Sapi. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Steel RGD, Torrie. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik*. Alih Bahasa B. Sumantri, Edition kedua, Cetatan 2. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Tammasia M, Nutinck F, May-Panloup P, Reynier P, Heyman Y, Charpiguy G, Stojkovic M, Heindleder S, Renard JP, Chastant-Maillard S. 2004. In vitro embryo production efficiency in cattle, and its association with oocyte adenosine triphosphat content quantity mitochondrial DNA and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol. Reprod.* 71:697-704.
- Tanaka H, Herliantien, Herwiyanti E, Lubis OP, Buwono, Pujianto J. 2002. The Aftercare Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project. Japan International Cooperation Agency. p.2
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. 2002. Minireview: function of cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. In: *Gene expression profil of cumulus cells derived from*.
- Toelihere MR. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. CV. Angkasa. Bandung.
- Widiastuti E. 2001. Kualitas Semen Beku Sapi FH Dengan Penambahan Antioksidan Vitamin C dan E. [Skripsi]. Fakultas Peternakan IPB. Bogor.
- Zilli, Loredana, Roberto Sciavone, Vincenzo Zonno, Rocco Rossanao, Carlo Storelli, Sebastiano Viella. 2005. Effect of Cryopreservation on Sea Bass Sperm Protein. *Journal Biolog of Reproduction*. 72:1262-1267.
- Zribi N, Chakroun NF, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Keskes LA. 2010. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 93(1):159-166.